

1/7/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

007999340

WPI Acc No: 1989-264452/198937

Alkaline phosphatase bio-technological prodn. - using *Bacillus licheniformis* 41P ZIMET 10911

Patent Assignee: VE BIOTECHN BERLIN (BIOT-N)

Inventor: KORN U; LEBENTRAU B

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DD 266710	A	19890412	DD 251784	A	19830606	198937 B

Priority Applications (No Type Date): DD 251784 A 19830606

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
DD 266710	A		9		

Abstract (Basic): DD 266710 A

In a new process for the biotechnological prodn. of alkaline phosphatase, the strain *Bacillus licheniformis* 41p (ZIMET 10911; morphological and other characteristics given in the specification) is used.

The composition of the C-, N- and P-sources of the nutrient medium is pref. such that during the phase of intensive alkaline phosphatase accumulation the glucose content of the medium is 0%, the phosphate content is less than 7mM and the NH₄ concentration is not more than 30 mcg/ml. Glucose feeding is pref. carried out during the transitional phase. The fermentation medium is pref. subjected to intensive mixing and the fermentation is pref. carried out at 34-40 deg. C (esp. 37 deg. C).

USE/ADVANTAGE - Alkaline phosphatase is used in clinical diagnostics and in biological and molecular-biological research. High yields of a product with enzymatic activity as high as that of the product obtained from calf intestine. Unlike the *E. coli* previously used for alkaline phosphatase prodn., *Bacillus licheniformis* is toxicologically and pathologically harmless.

0/0

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Additional): C12N-009/16; C12R-001/10



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz

(19) DD (11) 266 710 A

4(51) C 12 N 9/16
C 12 R 1/10

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21)	WPC 12 N / 251 784 0	(22)	06.06.83	(45)	12.04.89
------	----------------------	------	----------	------	----------

(71)	VE Forschungszentrum Biotechnologie Berlin, Alt-Stralau 62, Berlin, 1017, DD
(72)	Korn, Ulrich, Dr. Dipl.-Biol.; Lebentrau, Brigitte, Dipl.-Biol., DD

(54)	Verfahren zur biotechnischen Herstellung von alkalischer Phosphatase
------	--

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur biotechnischen Herstellung von alkalischer Phosphatase mittels *Bacillus licheniformis*. Ziel der Erfindung ist die Entwicklung eines technischen Verfahrens zur Herstellung von alkalischer Phosphatase. Das Ziel der Erfindung wird durch die Verwendung des Stammes *Bacillus licheniformis* 41p – ZIMET 10 911 – erreicht. Die C-, N- und P-Quellen des Nährmediums werden so kombiniert, daß durch die metabolische Wirkung der Kultur in der Phase der intensiven alkalischen Phosphatase-Akkumulation der Glucosegehalt des Nährmediums 0%, der Phosphatgehalt < 7 mM und die NH_4 -Konzentration nicht mehr als 20 bis 30 µg/ml beträgt. Optimierungen des Verfahrens können durch Glucosefeeding in der Übergangsphase der Kultur, durch intensive Durchmischung des Fermentationsmediums und Einhaltung einer bestimmten Fermentationstemperatur erzielt werden.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur biotechnischen Herstellung von alkalischer Phosphatase, dadurch gekennzeichnet, daß der Stamm *Bacillus licheniformis* 41p - ZIMM 10 911 - verwendet wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß die C-, N- und P-Quellen des Nährmediums so kombiniert werden, daß durch die metabolische Wirkung der Kultur in der Phase der intensiven alkalische Phosphatase-Akkumulation der Glucosegehalt des Nährmediums 0 %, der Phosphatgehalt $< 7 \text{ mM}$ und die NH_4 -Konzentration nicht mehr als 20 bis $30 \mu\text{g/ml}$ beträgt.
3. Verfahren nach den Punkten 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß in der Übergangsphase ein Glucosefeeding erfolgt.
4. Verfahren nach den Punkten 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Fermentationsmedium intensiv durchmischt wird.
5. Verfahren nach den Punkten 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Fermentation bei einer Temperatur von 34 bis 40°C , insbesondere bei 37°C , erfolgt.

Caseinagar:	Glucoso	0,5 %
	Casein	0,5 %
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,6 %
	KH_2PO_4	0,1 %
	Agar-Agar	2,5 %
Vorkulturmedium:	Glucose	2,0 %
	Trockenhöfe	0,5 %
	Weizenfeinschrot	0,5 %
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,4 %
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1 %
Produktionsmedium:	Stärkehydrolyse- produkt	5 %
	Sojaschrot	4 %
	Casein	1,6 %
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,8 %
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,05%

Beispiel 2

Anzucht und Fermentation erfolgen wie im Beispiel 1, nur mit dem Unterschied, daß die Rührung 700 U/min beträgt und von der 12. bis zur 20. Fermentationsstunde insgesamt 9 g Glucose zugefüttert werden. Die Ausbeute konnte auf 2,7 IE/ml gesteigert werden.

Die quantitative Bestimmung der alkalischen Phosphatase erfolgte unter optimalen Bedingungen bei 37 °C in 1 M Diäthanolamin-HCl, pH 9,5 (modifiziert nach K. YAMANE und B. MARKO (1978) J. Bacteriol. 134, 100). Als Substrat diente 5,5 mM p-Nitrophenylphosphat.

Eine IE (internationale Einheit) ist definitionsgemäß die Menge alkalische Phosphatase, die die Freisetzung von 1 µMol p-Nitrophenol je Minute unter den Bedingungen der Prüfmethode bewirkt.

Die bekannten Verfahren - bis auf die, bei denen klonierte Mikroorganismen verwendet werden - bringen nur geringe Enzymausbeuten, so daß zur Zeit noch vorrangig die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm gewonnen wird.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zur technischen Gewinnung von alkalischer Phosphatase mittels *Bacillus licheniformis* zu entwickeln.

Darstellung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, mit einem besonderen *Bacillus licheniformis*-Stamm eine alkalische Phosphatase in hoher Ausbeute zu produzieren.

Erfindungsgemäß wird für die Herstellung der alkalischen Phosphatase *Bacillus licheniformis* 41p - ZIMET 10 911 - verwendet, der sich vom Typstamm *Bacillus licheniformis* ATCC 14 580 in mehreren Positionen unterscheidet (vgl. dazu nachfolgende Charakteristik mit BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. (1974)).

Charakteristik des *Bacillus licheniformis* 41p - ZIMET 10 911

Morphologie

Form der Spore:	oval
Lage der Spore:	zentral
Sporulationsverhalten:	95 % (Gerstenschrotagar 10 d/ 37 °C)
Beweglichkeit:	beweglich
Gramverhalten:	grampositive Kurzstäbchen

Koloniemorphologie auf unterschiedlichen Nährböden

Bluplatte:	Kolonie hellbeige, milchig, mattglänzend, gelappt, α -Hämolyse nach 48 h/37 °C
------------	--

Nähragar (NA):	Kolonie hellbeige, milchig, mattglänzend, gelappt
NA + Gluc. + Cas.-Acid:	Kolonie mauve/rosé, mattglän- zend, Farbstoffbildung
Biochemische Merkmale	
Säurebildung aus:	D(+)-Xylose, Glucose, d-Mannose, d-Fructose, Maltose, Trehalose, Saccharose, Raffinose, Rhamnose, D-Mannit, d-Sorbit, D-Ribose, Aesculin
keine Säurebildung aus:	L-Arabinose nach 24 h, d-Galac- tose
Indolnachweis:	-
VPR:	+
Citratverwertung:	+
Ureasenachweis:	-
Arginindihydrolase:	+
Wachstumsverhalten und biochemische Merkmale	
Wachstum in Nährbouillon:	Hautbildung, Trübung, Bodensatz
Wachstum auf Glucose-	
Nitrat-Agar:	starkes Wachstum
Wachstum auf Glucose-	
Asparagin-Agar:	schlechtes Wachstum
Wachstum in NaCl-Bouillon:	3 - 7 % NaCl gutes Wachstum 10 % NaCl schwaches Wachstum
Gasbildung aus Nitrat un- ter anaeroben Bedingungen:	-
Nitratreduktion:	+
Katalase:	+
Stärkehydrolyse:	+ HZ 2 mm
Caseinhydrolyse:	+ HZ 1 mm
Gelatinehydrolyse:	+ HZ 4 mm
Lecithinase:	-
HZ = Hydrolysezone	

Die Herstellung des Enzyms kann im Submersverfahren in zwangsbelüfteten, sterilisierbaren Fermentationstanks unter üblichen biotechnologischen Bedingungen erfolgen. Es wurde jedoch gefunden, daß den Eigenschaften des Stammes angepaßte Verfahrensbedingungen zu höheren Enzymausbeuten führen.

In Nährmedien mit für bakterielle Verfahren häufig verwendeten C-Quellen, wie Glucose, Maltose, Mais- bzw. Kartoffelstärke und Getreideschroten, und üblichen N-Quellen, wie Sojaprotein, Casein, Magermilchpulver, Erbsen- und Bohnenmehl sowie Gelatine, bildet der erfindungsgemäße Stamm in ökonomisch interessanten Mengen alkalische Phosphatase.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens zur biotechnischen Herstellung von alkalischer Phosphatase mit *Bacillus licheniformis* 41p - ZIMET 10 911 - werden die C- und N-Quellen des Nährmediums so kombiniert, daß durch die metabolische Wirkung der Kultur in der Phase der intensiven alkalischen Phosphatase-Akkumulation der Glucosegehalt des Nährmediums 0 %, der Phosphatgehalt $< 7 \text{ mM}$ und die NH_4 -Konzentration nicht mehr als 20 bis $30 \mu\text{g/ml}$ beträgt. Die Akkumulation der alkalischen Phosphatase wird durch ein Glucosefeeding in der Übergangsphase und durch intensives Durchmischen des Fermentationsmediums gesteigert. Die Fermentationstemperatur beträgt 34 bis 40°C , insbesondere 37°C .

Bacillus licheniformis 41p - ZIMET 10 911 - synthetisiert alkalische Phosphatase, die zu über 90 % an Partikel bzw. Membranbruchstücke assoziiert ist. Das Enzym kann in bekannter Weise, z. B. durch MgCl_2 , von den Membranbruchstücken gelöst und anschließend gereinigt werden (F.M. HULETT-COWLING 1971, Biochem. 10, 1364 bis 1371; G. SCHAFFEL et al. 1978, Biochim. Biophys. Acta 526, 457 bis 467).

Prozeßanalysen gaben wichtige wissenschaftliche Grundlagen für die oben angegebene Verfahrensführung:

- Die intensive Akkumulation an alkalischer Phosphatase er-

folgt in der stationären Wachstumsphase der Kultur, und zwar dann, wenn das Nährmedium total an Glucose verarmt und der Phosphatgehalt unter 7 mM abgesunken ist. Der Phosphatgehalt ist etwa 50fach höher als bei in der Literatur (V. JEANNODA & G. BALASSA (1978) Molec. gen. Genet. 163, 65 bis 73) erwähnten alkalische Phosphatase-Synthesen mit Bacillen.

- Eine um 50 % höhere Akkumulation an alkalischer Phosphatase wird durch ein Glucosefeeding in der Übergangsphase der Kultur erreicht. Die Technologie des Glucosefeedings erfolgt in der Weise, daß die Konzentration an freier Glucose in der Kulturlösung etwa 2 Stunden nach Beendigung der Zufütterung 0 % beträgt.
- Die Syntheserate der alkalischen Phosphatase von *Bacillus licheniformis* wird ganz entscheidend durch die Intensität der Durchmischung der Kulturlösung beschleunigt. So wird allein durch die Erhöhung der Rührgeschwindigkeit des Laborfermenters von 600 auf 800 rpm bei gleichbleibendem Lufteintrag zum gleichen Fermentationszeitpunkt eine um das 10fache höhere alkalische Phosphatase-Aktivität gemessen.
- Die optimale Fermentationstemperatur liegt bei 37 °C. Eine Abweichung um ± 3 °C bewirkt bereits eine merkliche Senkung der Enzymsausbeute.
- Um eine ungestörte alkalische Phosphatase-Akkumulation zu erreichen, ist das Nährmedium aus den aufgeführten C- und N-Quellen so zusammenzusetzen, daß durch die metabolische Wirkung der Kultur in der Phase der intensiven Produktbildung die Konzentration des Phosphates < 7 mM ist und nicht mehr als 20 bis 30 µg/ml Ammonium freigesetzt werden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können Enzymaktivitäten erreicht werden, die die Höhe der aus Kälberdarm gewinnbaren

Aktivitäten erreichen, so daß eine technische Produktion bakterieller alkalischer Phosphatase ökonomisch sinnvoll ist.

Gegenüber der bisher durchgeführten kleintechnischen Produktion von alkalischer Phosphatase mit *E. coli* hat *Bacillus licheniformis* 41p - ZIMET 10 911 - den Vorteil, toxikologisch und pathologisch unbedenklich zu sein.

Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Der Bakterienrasen einer 48 h bei 37 °C bebrüteten Schrägagarkultur *Bacillus licheniformis* 41p - ZIMET 10 911 - auf Caseinagar wird mit sterilem Leitungswasser abgeschwemmt und in 50 ml eines Vorkulturmediums in 500 ml-Rundstehkolben übertragen. Nach einer Inkubation von 7 h bei 37 °C auf einer Schüttelmaschine mit 220 U/min werden ca. 4 bis 6 x 10⁸ Zellen/ml erreicht. Damit werden die Produktionsmedien so beimpft, daß etwa 3 x 10⁷ Zellen/ml Kulturlösung vorhanden sind.

Der Fermentationsprozeß mit dem nachfolgend aufgeführten Produktionsmedium erfolgte in einem Laborfermenter mit 1,5 l Nettovolumen. Die Fermentationstemperatur lag bei 37 °C, der Lufteintrag betrug 1 vvm bei 800 U/min. Der Anfangs-pH-Wert lag bei 6,5, zum Zeitpunkt des Abbaus lag er bei pH 7,0. Unter diesen Bedingungen bildet der erfindungsgemäße *Bacillus licheniformis* 41p durchschnittlich 2,2 IE alkalische Phosphatase pro ml Kulturzentrifugat, das bei 6 000 U/min 10 Minuten zentrifugiert wurde.

Zusammensetzung der Nährböden für die Anzucht des Bakterienrasens und für die Vorkultur:

Titel der Erfindung

Verfahren zur biotechnischen Herstellung von alkalischer Phosphatase

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur biotechnischen Herstellung von alkalischer Phosphatase mit einem *Bacillus licheniformis*-Stamm. Das Enzym kann in der klinischen Diagnostik sowie in der biochemischen und molekularbiologischen Forschung eingesetzt werden.

Charakterisierung der bekannten technischen Lösungen

Alkalische Phosphatase wird von einer Vielzahl von Mikroorganismen synthetisiert. Unter den Bakterien sind zwar mehrere Spezies des Genus *Bacillus* dazu befähigt, so z. B. *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* und *Bacillus licheniformis* (J.G. HANSA et al. 1981, *Biochim. Biophys. Acta* 657, 390 bis 401; C. HYDREAN et al. 1977, *J. Biol. Chem.* 252, 6806; W.R. CHESBRO & J.O. LAMPEN 1968, *Bacteriol.* 96, 428 bis 437), aber die biotechnische Herstellung von alkalischer Phosphatase mit Bacillen ist bisher noch nicht bekannt.

Es existieren Verfahren zur Herstellung von alkalischer Phosphatase mit Hilfe von Mikroorganismen anderer Gattungen, so u. a. *Actinomyces coelicolor* A-66 (SU-UR 943 279), *Actinomyces streptomycin* (SU-UR 178 337) sowie mit *E. coli* und *Serratia marcescens*, die neukombinierte Plasmide mit Genen für alkalische Phosphatase enthalten (DE-OS 2 931 999).